

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 15/00 C12P 21/08, C12Q 1/68 C12N 1/21, G01N 33/53, 33/574 C12P 19/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/00430 (43) Date de publication internationale: 7 janvier 1993 (07.01.93)
--	-----------	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00589
(22) Date de dépôt international: 25 juin 1992 (25.06.92)

(30) Données relatives à la priorité:
91/07807 25 juin 1991 (25.06.91) FR

(71) **Déposant** (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (SNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PERBAL, Bernard [FR/FR]; 1, boulevard Beethoven, F-78280 Guyancourt (FR). MARTINERIE, Cécile [FR/FR]; 153, chemin de la Hunière, F-91120 Palaiseau (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc. ; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) **Etats désignés:** CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
recues.

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES HYBRIDIZABLE WITH THE NOV GENE OF CHICKENS

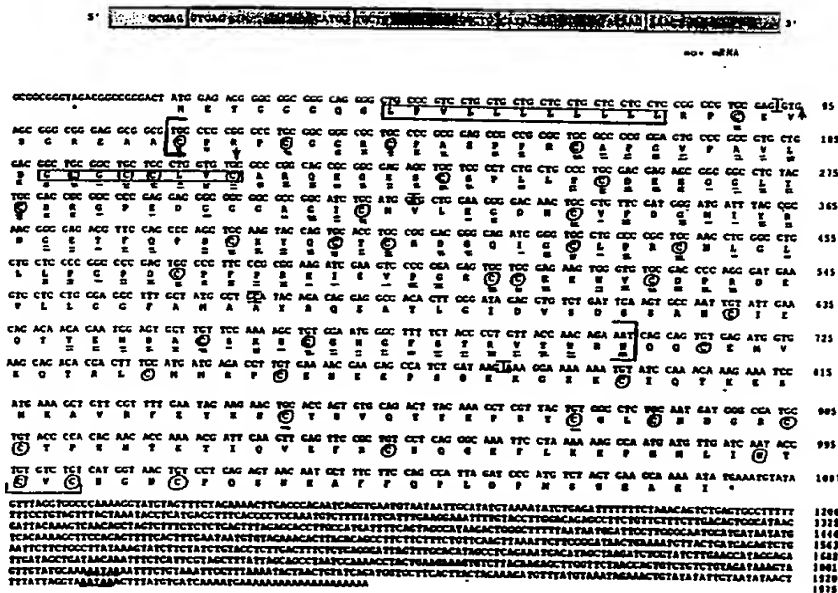
(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CAPABLES DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

(57) Abstract

Nucleotide sequences containing a concatenation of nucleotides which are hybridizable in stringent conditions (50 % formamide, 5XSC) with one or more sequences of the *nov* gene of chickens, wherein the cDNA of said gene comprises the nucleotide concatenation shown in the accompanying figure. These sequences may be used as probes for detecting complementary sequences to evaluate the development and/or differentiation of tumors.

(57) Abrégé

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSC) avec une ou plusieurs séquences du gène *nov* de poule dont l'ADNc comporte l'enchaînement de nucléotides représenté sur la figure. Ces séquences sont utilisables comme sondes de détection de séquences complémentaires pour l'évaluation du développement et/ou de la différenciation de tumeurs.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MI	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brsil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse			SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	KR	République de Corée	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LI	Liechtenstein	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LK	Sri Lanka	TC	Togo
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MC	Monaco		
ES	Espagne	MG	Madagascar		

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES, CAPABLE DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides et les séquences d'acides aminés correspondantes. Elle concerne également l'obtention de ces séquences et leurs applications.

Il est admis depuis de nombreuses années que le néphroblastome induit par le virus auxiliaire de la myéloblastose aviaire (MAV) constitue un modèle animal de la tumeur de Wilms chez l'enfant. Bien que ces deux types de tumeurs aient des étiologies différentes, aucun virus n'ayant été associé jusqu'à présent au développement du néphroblastome humain, on conçoit que l'étude, au niveau moléculaire des néphroblastomes viro-induits, peut permettre de caractériser des paramètres difficilement accessibles dans le système humain.

Les études des inventeurs concernant de tels néphroblastomes aviaires induits par le MAV leur ont permis de caractériser chez la poule un gène embryonnaire appelé gène *nov* dont l'expression s'avère stimulée à des niveaux variables dans les tumeurs, mais qui est éteint dans les cellules de rein adulte normal.

En développant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs ont élaboré des outils leur permettant d'étudier l'expression de gènes homologues dans les tumeurs humaines et dans certains types cellulaires.

Ainsi, en clonant les séquences désoxyribonucléiques et un ADN complémentaire correspondant au gène *nov* des cellules normales de poule, les inventeurs ont établi la séquence nucléotidique partielle des ADN et la séquence nucléotidique complète de l'ADNc. Des sondes moléculaires spécifiques ont été établies sur la base de cette séquence

et utilisées pour détecter la présence et l'expression de gènes homologues dans divers types cellulaires humains.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides d'un gène impliqué notamment dans les cellules tumorales.

Elle a également pour but de fournir des moyens pour l'isolement de ces séquences.

L'invention vise en outre les protéines codées correspondantes et les anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre ces protéines.

L'invention vise de plus l'utilisation de ces séquences, protéines et anticorps dans des applications biologiques, en particulier dans des tests de détection.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide 5 XSCC), avec une ou plusieurs séquences du gène *nox* de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I), plus spécialement avec l'enchaînement (II).

Les enchaînements des séquences de nucléotides et de protéines auxquels il est fait référence dans la description et les revendications sont donnés en fin de description.

La séquence nucléotidique entière du clone d'ADNc *nox* de poule est formée de 1975 pb et comprend au moins 5 exons. Cette séquence comprend un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb, codant pour une protéine potentielle de 32300 Da, allant du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux signaux de motifs potentiels

de polyadénylation AATAAA en position 1914 et 1932. Ce gène *nox* de poule est surexprimé dans des néphroblastomes aviaires induits par MAV étudiés par les inventeurs.

Les expériences d'hybridation réalisées dans des conditions stringentes définies ci-dessus montrent que, de manière inattendue, des séquences homologues du gène *nox* de poule existent dans le génome humain.

Les séquences homologues isolées, chez l'homme ou l'animal, sont utilisables pour le criblage de banques réalisées à partir d'ARN-m, et permettent d'isoler des ADNc et ainsi d'identifier les autres exons des gènes de la même famille. Ces exons et les gènes qui les renferment, ainsi que les protéines codées correspondantes font également partie de l'invention.

On a indiqué ci-dessus que les expériences d'hybridation étaient réalisées dans des conditions stringentes, ce qui permet d'isoler des séquences présentant de fortes homologies avec celles des sondes.

Ces expériences peuvent être également réalisées dans des conditions non stringentes, en réduisant la quantité de formamide, de sel et/ou le temps de lavage, comme décrit dans "A practical guide to molecular cloning", second edition, B. Perbal, John Wiley and Sons, New York, 1988. Les séquences isolées présenteront alors une homologie moins forte que précédemment avec les séquences des sondes et conduiront à l'identification d'exons présentant moins de séquences communes.

Des séquences de nucléotides de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du

deuxième exon du gène *nox* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

Les lettres indiquées dans ces enchaînements présentent les significations conventionnelles figurant dans l'ouvrage de Perbal cité plus haut.

L'invention vise en particulier les séquences nucléotidiques comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 70 % avec le fragment de protéine, correspondant au deuxième exon du gène *nox* de poule, répondant à la séquence (IV).

Les séquences de nucléotides capables de s'hybrider avec l'enchaînement (III) ci-dessus sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique, dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant, ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question, sont représentées sur la figure 2A.

De telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (V).

On notera la présence, dans ces séquences d'acides aminés rencontrées chez l'homme, d'une séquence consensus de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF). Cette séquence apparaît donc conservée chez l'homme.

Les différentes séquences évoquées ci-dessus comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (VI) suivant, correspondant au fragment Pst I mentionné plus haut, plus spécialement de l'enchaînement (VII).

L'enchaînement (VII) comporte 225 nucléotides avec 70 % d'homologie environ avec l'exon 2 du gène *nox* de poule.

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène *nox* de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

Des séquences du type défini ci-dessus comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 73 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène *nox* de poule répondant à la séquence (IX).

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 800 pb et d'un fragment PstI de 2 kb, tels qu'obtenus à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question est représentée sur la figure 2A.

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) d'acides aminés. On observera que cette séquence d'acides aminés peut être mise en évidence chez l'homme.

Ces séquences d'acides aminés comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement de l'enchaînement (XII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène *nox* de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XIII).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 85 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène *nox* de poule répondant à la séquence (XIV).

De telles séquences, capables de s'hybrider avec au moins une partie de l'enchaînement (XIII) ci-dessus, sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment *HincII* d'environ 400 pb, tel qu'obtenu selon les méthodes évoquées ci-dessus pour les autres fragments de restriction (voir figure 2B).

Selon un autre aspect, ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XV).

Les séquences évoquées ci-dessus en rapport avec le quatrième exon du gène *nox* de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XVI), correspondant au fragment *HincII* mentionné plus haut, plus particulièrement de l'enchaînement XVII.

D'autres séquences de nucléotides encore, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider avec au moins une partie du premier exon du

gène nox de poule qui comprend la séquence nucléotidique XVIII.

Selon un autre aspect, de telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 30 % avec le fragment de protéine correspondant au premier exon du gène nox de poule répondant à la séquence (XIX).

De telles séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XX).

Les séquences définies ci-dessus en rapport avec le premier exon du gène nox de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nox de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

De telles séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles codent pour un fragment de protéine répondant à l'enchaînement (XXIII) suivant d'acides aminés.

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb tel qu'obtenu selon le protocole évoqué plus haut (voir figure 2B).

Des séquences du type de celles du fragment PstI de 700 pb ci-dessus sont plus particulièrement

caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène nox de poule qui comprend la séquence (XXIV).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène nox de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXV).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXVI) d'acides aminés.

On observera que cette séquence peut être mise en évidence chez l'homme. Ces séquences comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXVII), plus particulièrement de l'enchaînement (XXVIII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nox de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XXIX).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 80 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nox de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXX).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXXI).

Ces séquences sont formées par ou comprennent plus particulièrement l'enchaînement nucléotidique (XXXII).

Selon un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription.

L'invention vise également les séquences promotrices des gènes comportant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Elle vise en particulier au moins une partie de la séquence promotrice du gène *nox* humain dont les exons^{un} deux, trois et quatre sont donnés sur la figure 2A. Cette séquence promotrice qui correspond à l'enchaînement (XXXIII) est localisée dans un fragment PstI-Hind III de 2,2 kb et comprend les 283 nucléotides en amont au début du premier exon.

La séquence promotrice du gène *nox* humain est caractérisée en ce qu'elle comporte plusieurs séquences consensus de différents facteurs de transcription tels que NF1 (TGGCCTTCTGCCAATC), AP1 (TGACTAA) et Sp1 (GCCACTCCCC).

Elle comprend également une séquence de vingt répétitions de motifs TG qui peut constituer une séquence de polymorphisme, conférant un intérêt à cette séquence comme marqueur de polymorphisme.

L'invention vise également la séquence promotrice du gène CTGF identifiée dans le fragment EcoRI - PstI de 700 pb environ, qui correspond à l'enchaînement (XXXIV).

Cette séquence est caractérisée en ce qu'elle comporte des sites de fixation des facteurs de transcription tels que SRF (CCTAAAAAGG), AP1 (TGAATCA), Sp1 (CCCGCCC), un site potentiel de fixation à la protéine Wt1 (CGCCCCGGC) et un site NF kappa B (GAGAGCCCC). Elle comporte également une TATA base (TATAAAA).

La séquence promotrice du gène *nox* de poule répondant à l'enchaînement (XXV) fait également partie de l'invention.

Cette séquence est contenue dans un fragment SmaI-XhoI d'environ 1 kb qui comporte des séquences consensus de différents facteurs de transcription ainsi qu'une TATA base. Elle est caractérisée en particules en ce qu'elle comprend les sites suivants de fixation du facteur Sp1 : GGGGGCGGGG, CCCCCGCCTC, Ap2 : CCGCAGGC, GGCGGGGC, GGGTCCC.

Elle comprend également un site de fixation du facteur NF kappa E2 (GGCAGGTGG) et du facteur NFkB (GGGAGTTTC).

Il est entendu que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées. Les séquences correspondantes entrent dans le cadre de l'invention, dès lors qu'un fragment de ces séquences utilisé comme sonde donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour des protéines telles que définies ci-dessus exprimées dans les cellules tumorales.

L'invention vise également en tant que nouveaux produits les ARN correspondant aux différentes séquences définies ci-dessus et les séquences complémentaires des différents enchaînements nucléotidiques définis.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Les souches de microorganismes transformées ou transfectées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

Elle vise également les séquences d'acides aminés correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides définies plus haut, et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.

Les séquences d'acides aminés homologues à celles codées par l'exon 2, qui contiennent le site de liaison aux facteurs de croissance IGF présentent un intérêt particulier, étant donné que le gène IGFII, qui se trouve chez l'homme sur le chromosome 11p15, est surexprimé dans certaines tumeurs de Wilms et pourrait donc être impliqué dans cette pathologie.

Dès lors que le motif consensus des protéines se liant à l'IGF joue un rôle important dans le développement des néphroblastomes en conjonction avec la dérégulation de l'expression d'IGFII, on mesure l'intérêt de la détection d'une expression anormale des protéines de l'invention qui renferment un tel motif.

Les protéines de l'invention sont également caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

La production de ces protéines par un tel procédé fait également partie de l'invention.

Les protéines de l'invention et leurs fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement un épitope des protéines ci-dessus, ou d'un fragment de ces protéines, sont également visés par l'invention.

L'invention vise en outre les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques purifiés, ou d'ARN correspondants, de sondes moléculaires pour rechercher la présence éventuelle de séquences de nucléotides apparentées au gène *nox* dans divers types cellulaires.

L'élaboration de ces sondes comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrin.

Les essais effectués pour détecter la présence de séquences complémentaires dans diverses tumeurs et tissus humains ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments intragéniques.

L'utilisation de ces sondes a ainsi permis de montrer que le gène renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus est exprimé dans plusieurs types de cellules humaines, y compris certaines tumeurs du rein.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le gène humain apparenté au gène *nox* de poule comme défini plus haut entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant les nucléotides à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec l'échantillon biologique à tester ou

leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit étudié.

On peut, par exemple, avoir recours à la méthode d'hybridation sur taches ou à la méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Dans la première méthode, selon la technique classique, on dépose une quantité aliquote d'ADN dénaturé sur des membranes de nitrocellulose. La deuxième méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles.

Ces sondes constituent des marqueurs tumoraux en permettant la détection précoce de l'expression du gène renfermant lesdites séquences nucléotidiques, qui normalement n'est pas ou peu exprimé dans les tissus normaux correspondants. L'invention fournit ainsi des moyens permettant d'évaluer le développement et/ou la différenciation tumorale.

La détection pour l'identification spécifique des ADN peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR) telles que décrites dans les brevets US 4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corporation.

Dans ces techniques, on utilise deux amorces d'environ une quinzaine de nucléotides comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus et distantes d'environ 200 à 250 nucléotides. L'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides de l'un des brins du fragment d'ADN à amplifier et située au niveau de l'une des extrémités de ce fragment, par exemple à l'extrémité 5'. L'autre séquence est capable

de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, et se trouve située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle mentionnée plus haut (à l'extrémité 3', lorsque la première se trouve à l'extrémité 5').

L'invention vise également un procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences complémentaires de celles définies ci-dessus. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique à étudier avec une sonde nucléotidique telle que définie plus haut dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée,

- la détection du complexe d'hybridation.

Le cas échéant, on procède à une amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces, telles que décrites ci-dessus, susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides.

L'utilisation d'un tel procédé représente une augmentation de sensibilité et un gain de temps considérable par rapport aux techniques classiques qui nécessitent souvent une technologie ne pouvant être mise en oeuvre que dans des services spécialisés. Il permet de plus une détection rapide et de grande spécificité des ADN et des différentes espèces d'ARNm de transcription. Ce procédé constitue un moyen de détection d'un remaniement

chromosomique au niveau des gènes qui codent pour les ARN nov ou CTGF sans avoir recours à des cultures cellulaires.

Pour la mise en oeuvre d'une telle méthode de dépistage in vitro, basée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés lors de la réaction immunologique.

La présence dans les protéines de l'invention d'une séquence de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF) est avantageusement mise à profit selon l'invention pour le dosage des protéines. A cet effet, on met en contact les protéines de l'échantillon biologique à étudier avec un IGF comportant un groupe marqué, par exemple un groupe radioactif ou sonde froide et on effectue le dosage de la quantité de produit fixé.

On rapporte ci-après à titre d'exemples non limitatifs le clonage et le séquençage du gène nox de poule, et de séquences de nucléotides répondant aux définitions données plus haut. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 et 2,

- la figure 1 représentant la séquence d'ADNc du gène nox de poule et celle de la protéine potentielle codée

- les figures 2 A et 2 B les cartes de restriction de fragments d'ADN de l'invention

Procédés de clonage moléculaire et séquençage rapportés dans les exemples :

purification des acides nucléiques : utilisation de dichlorométhane comme décrit dans V. Maloisel et al., Met. Mol. Cell. Biol. 1, 245-247, 1990.

Southern et Northern blots, et autres procédés de clonage : effectués selon les protocoles standards publiés par B. Perbal dans "A practical guide to molecular cloning, second edition, B. Perbal John Wiley and Sons, New York, 1988

purification des fragments d'ADN BamHI-HindIII de 7 kb et SacI de 6,6 kb : méthode Geneclean (Bio 101).

Sondes radioactives : préparées par nick translation en présence d' α dCTP 32p.

Séquençage des nucléotides : selon la méthode de terminaison de chaîne au didéoxy en présence d' α dATP 35S, de T7 polymérase ou de Séquenase (USB).

Exemple 1 :

Isolement de l'ADNC du gène *nox* de poule

25 ng d'ADNC correspondant à de l'ARN poly A de fibroblastes d'embryons de poule de 13 jours sont ligaturés avec 1 µg de bras lambda gtl0 pour préparer une banque d'ADNC de fibroblastes normaux de poule en utilisant le kit d'Amersham.

Après criblage avec une sonde cellulaire dérivée d'une tumeur, on purifie 7 clones, l'insert le plus long (1,9 kb) est purifié selon la méthode de Geneclean (BIO 101) et sous-cloné au site KpnI de Bluescript KS⁺ (Stratagène) pour générer le clone pClK.

Séquençage nucléotidique :

Le séquençage est réalisé par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy-nucléotide en présence d' α 35S dATP et de polymérase T7 (Pharmacia) ou de Séquenase dans les conditions décrites par les fabricants.

Des matrices sont obtenues à partir des clones recombinants M13mp18 et M13mp19. Les amorces de séquençage proviennent de Biolabs, New England. Les compressions GC sont résolues en utilisant la déoxy-inosine (USB).

Caractérisation du gène cellulaire *nox* :

On effectue une analyse par Northern Blot d'ARN isolés de reins normaux, de fibroblastes d'embryons de poule (FEP) et de néphroblastomes en utilisant les sondes cellulaires dérivées d'une tumeur. La sonde HX1024 permet de détecter dans les FEP normaux une espèce d'ARNm de 2,2 kb dont l'expression est altérée dans tous les autres néphroblastomes. Le criblage d'une banque d'ADNC de FEP permet d'isoler un clone d'ADNC de 1,9 kb représentant l'ARNm de 2,2 kb exprimé dans les FEP normaux.

On a représenté sur la figure 1 la séquence entière nucléotidique de 1975 pb du clone d'ADNc de ce nouveau gène, surexprimé dans les néphroblastomes étudiés, appelé gène *nov*. Ce gène apparaît constitué de 5 exons. Un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb codant pour une protéine potentielle de 32300 Da a été identifié du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux motifs potentiels de signaux de polyadénylation (AATAAA) aux positions 1914 et 1932.

On a également indiqué sur cette figure les acides aminés potentiellement codés. Le polypeptide *nov* potentiel contient un noyau hydrophobe caractéristique d'un signal peptidique à son extrémité amino (avec 6 leucines). Cette protéine *nov* étant dépourvue d'autres régions hydrophobes présentes dans les protéines trans-membranaires, il est vraisemblable qu'elle est sécrétée. La protéine *nov* contient également le motif consensus GCGCCXXC des protéines liant les facteurs de croissance du type insuline (IGF) et un total de 39 résidus cystéine ne formant pas de cluster.

Exemple 2 : Isolement dans des cellules humaines de séquences de nucléotides apparentées au gène *nov* de poule.

On effectue un Southern blot de fragments d'ADN humain digéré par EcoRI avec le clone d'ADNc du gène *nov* de poule pClK. On opère dans les conditions stringentes rapportées par B. Perbal (voir référence ci-dessus).

On constate que quatre fragments EcoRI s'hybrident avec des séquences du gène *nov* de poule. Ces fragments comportent respectivement 15, 12, 8 et 5,6 kb.

Exemple 3 : Isolement de séquences de nucléotides apparentées au gène *nov* de poule.

A partir d'une banque d'ADN de placenta humain, on isole à l'aide de la sonde pClK radiomarquée deux groupes de clones lambda gtl1 recombinants.

La carte de restriction partielle de lambda Hu92 (qui correspond à trois clones se chevauchant) et de lambda Hu93 (qui correspond à deux clones se chevauchant) et celles des sous-clones plasmidiques pBH7 et p56 sont représentées sur les figures 2A et 2B.

Les séquences de nucléotides humaines homologues à celles du gène *nox* de poule sont localisées dans un fragment d'ADN de 7,0 kb BamHI-HindIII du clone Hu92 et celles appartenant au gène CTGF dans un fragment d'ADN de 6,6 kb SacI du clone Hu93.

Sur ces cartes, les enzymes de restriction sont désignées comme suit : B = BglII, P = PstI, K = KpnI, H = HindIII, S = SacI, E = EcoRI, X = Xba, B = BamHI et Hc = HincII. Les blocs noirs représentent les régions exoniques humaines.

Le sous-clonage de ces fragments dans les vecteurs pUC18 et pUC19, appelés respectivement clones pBH7 et p56 permet de localiser plus précisément les séquences homologues du gène *nox* de poule et les séquences du gène du CTGF. Les premières sont localisées d'une part dans un fragment d'ADN PstI de 600 pb (E2), d'autre part dans un fragment PstI de 800 pb (E3), et dans un fragment HincII de 400 pb (E4). La sonde pBH7 correspond au fragment HindIII-BamHI.

La localisation des premier, deuxième, troisième, quatrième et cinquième exons humains au CTGF sont indiquées sur la figure 2B (désignations respectives E1, E2, E3, E4, et E5).

L'utilisation des fragments PstI d'ADN purifiés comme sondes dans des expériences d'hybridation Southern avec les fragments EcoRI de l'exemple 2 conduit à la seule détection du fragment EcoRI d'ADN de 12 kb avec PB06 et du fragment EcoRI de 15 kb avec PSP07 démontrant que les séquences de PB06 et PSP07 correspondent à un sous-ensemble des exons nov de l'ADNc de poule.

Exemple 4 : Détection d'ARN du génome humain apparentés au gène nov de poule.

On rapporte dans le tableau suivant les résultats d'expériences d'hybridation Northern avec différents tissus et lignées cellulaires en utilisant comme sondes les enchaînements de formule VIII, XV et XVI ci-dessus homologues respectivement des exons E2, du gène nov de poule et E3 et E4 du gène CTGF (ces codes étant utilisés dans le tableau pour les désigner).

TISSUS ET LIGNEES CELLULAIRES

SONDES

	E2 (<u>nov</u>)	E3-E4 (CTGF)	kb de l'ARNm
Moelle osseuse	+	+	(2,)
thymus (foetal)	+	+	(2,5) (7,4)
Foie (foetal)	-	-	(2,5)
HEL	-	+	(2,5)
Cerveau (foetal)	+	-	(2,5)
	-	+	(7,4)
Neuroblastome 1	+	+	(2,5)
Neuroblastome 162	+	+	(2,5)
	-	+	(7,4)
Rein (foetal)	+	+	(2,5)
Nephroblastome Bou	nt	+	(2,5)
Tissu mammaire	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire gg	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire sc	nt	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)
SK-BR3	-	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)

poumon (foetal)	+	+	(2,5)
coeur (foetal)	+	+	(2,5)
lignée 293	+	+	(2,5)
	.	.	.
MCF7	-	+	(7,4)
Carcinome embry test. 8	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 10	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 11	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Adenocarcinome U377	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
HL60	nt	+	(7,4)

nt = non testé

Les résultats obtenus montrent que le gène humain homologue du gène *nox* de poule et le gène CTGF appartenant à la même famille sont exprimés selon les tissus ou lignées sous la forme de différentes espèces d'ARN détectés soit par les deux sondes, soit par une seule d'entre elles.

L'espèce d'ARNm de 7,4 kb exprimée par certains tissus et lignées n'apparaît reconnue que par la sonde PSP07.

Ces résultats indiquent que la régulation des gènes chez l'homme dépendrait de la spécificité tissulaire.

[illegible]

ENCIAINEMENT II

TGC	GGC	GGG	CGC	TGC	CCC	CGG	GNG	CCG	CCG	CGC	TGC	GCC	CCG	GGA	GTG	CCC	GCC	GTG	CTG	105							
CAC	CCC	TCC	CCC	TGC	CCC	CGG	CAG	CGC	GGC	GAG	AGC	TGC	CCC	CCT	CTG	CTG	GAC	GAG	AGC	GGC	215						
TGC	GAC	CGC	GGC	CCC	CAG	CAC	GGC	GGC	CCC	GGC	ATC	TGC	ATG	GTG	CTG	GNA	GGG	GAC	MAC	TGC	365						
MAC	GGG	CAG	ACG	ITC	CAG	CCC	AGC	TGC	ANG	TAC	CAG	TGC	ACC	TGC	CGG	GAC	ATC	CGG	CAG	ATC	455						
CTG	CTC	CCC	GGC	CCC	GAC	TGC	CCC	ITC	CCG	CSG	ANG	ATC	GNA	GTC	CCC	GGG	GNG	TGC	GAG	ANG	545						
GTG	CTC	CTG	CGA	GGC	TTT	GCT	ATG	GCT	GCA	TAC	AGA	CAG	GCC	ACA	CYT	GGG	ATA	GAC	CTG	TCT	615						
CAG	ACA	ACA	GAA	TGC	ACT	GCT	TGT	TCC	AAA	AGC	TGT	GGA	ATG	GGC	TTT	TCT	ACC	CGT	GTT	ACC	725						
ANG	CAG	ACA	CGA	CIT	TCC	ATG	ATG	AGA	CCI	TGT	GAA	AAC	GAA	GAG	CCA	TCT	GAT	ANG	AAA	GGG	AAA	AAA	TCT	ATC	CAA	ACA	ANG

ENCHAINEMENT III

101 111 121 131 141 151
 AGGTGAGCGG GCGGGAGGCG GCGTGCCCCC GGCCTGCGG CCGGCGCTGC CCGCGGAGC.

 161 171 181 191 201 211
 CGCCGCGCTG CGCCCCGGGA GTGCCCCGCGG TGCTGGACGG CTGCGGCTGC TGCCTGGTGT

 221 231 241 251 261 271
 GCGCCCCGCA GCGCGGCGAG AGCTGCTCCC CTCTGCTGCC CTGCGACGAG AGCGGCGGCC

 281 291 301 311 321
 TCTACTGCGA CCGCGGCCCC GAGGACGGCG GCGGCGCCCG CATCTGCATG

ENCHAINEMENT IV

33 43 53 63 73 83
 VSGREAAACPR PCGGRCPAEP PRCAPGVPAV LDGCGCCLVC ARQGESCSF LLPCESSGL

 93
 YCDRGPEDGG GAGICM

ENCHAINEMENT V

V	A	A	T	Q	R	C	P	P	Q	C	P	G	R	C
756				771					786					
P	A	T	P	P	T	C	A	P	G	V	R	A	V	L
801				816					831					
D	G	C	S	C	C	L	V	C	A	R	Q	R	G	E
846				861					876					
S	C	S	D	L	E	P	C	D	E	S	S	G	L	Y
891				906					921					
C	D	R	S	A	D	P	S	N	Q	T	G	I	C	T

ENCHAINEMENT VI

355	365	375	385	395	405
CTGCAGCCAA	CCGGCTTGTG	CGCGTCCCAG	GAGCGCGCTA	TAAACCTGT	GCTGGGCGTG
415	425	435	445	455	465
ATCGGCAAGC	ACCGGACCAG	GGGGAAGCGG	AGCAGTGCCA	ATCTACAGCG	AAGAAAGTCT
475	485	495	505	515	525
CGTTTGGTAA	AAGCGAGAGG	GGAAAGCCTG	AGCATGCAGA	GTGTGCAGAG	CACGAGCTTT
535	545	555	565	575	585
TGTCTCGCGA	AAGCAGTGCC	TTTGCCCTGAC	CTTCCTGCTT	CTCCAATCTCC	TGGGACAGTA
595	605	615	625	635	645
AGTGGCACAC	CCTTAAGATG	CCCCCAAAGT	TACTTTGCCC	GCCTTGGTGG	CCCCCATTTG
655	665	675	685	695	705
GTCACCGGGC	TCACTGCGTC	TTCTGTCCCCA	GCTGAGTGGT	TTCTCCTTGT	CTCGCCTGCC
715	725	735	745	755	765
TTCAGGTCGC	TGCGACTCAG	CGCTGCCCTC	CCCAGTGCCC	GGGCCGGTGC	CCTGCGACGC
775	785	795	805	815	825
CGCCGACCTG	CGCCCCCGGG	GTGCGCGCGG	TGCTGGACGG	CTGCTCATGC	TGTCTGGTGT
835	845	855	865	875	885
GTGCCCCCCA	GCGTGCGGAG	AGCTGCTCAG	ATCTGGAGCC	ATGCGACGAG	AGCAGTGGCC
895	905	915	925	935	945
TCTACTGTGA	TCGCAGCGCG	GACCCCCAGCA	ACCAGACTGG	CATCTGCACG	GGTAATCCTG
955	965	975			
CTCCCTCTGC	TGTTTGACCT	CTTCTCCTGC	AG		

ENCHAINEMENT VII

720 730 740 750 760 770
 GTCGCTGCGA CTCAGCGCTG CCCTCCCCAG TGCCCGGGCC GGTGCCCTGC GACGCCGCCG

 780 790 800 810 820 830
 ACCTGCGCCC CCGGGGTGCG CGGGGTGCTG GACGGCTGCT CATGCTGTCT GGTGTGTGCC

 840 850 860 870 880 890
 CGCCAGCGTG GCGAGAGCTG CTCAGATCTG GAGCCATGCG ACGAGAGCAG TGGCCTCTAC

 900 910 920 930
 TGTGATCGCA GCGCGGACCC CAGCAACCAG ACTGGCATCT GCACGG

ENCHAINEMENT VIII

331 341 351 361 371 381
 GTGCTGGAAG GGGACAACTG CGTGTTGAT GGGATGATTT ACCGCAACCG GGAGACGTTT

 391 401 411 421 431 441
 CAGCCCAGCT GCAAGTACCA GTGCACCCTG CCGGACGGGC AGATCGGGTG CCTGCCCCGC

 451 461 471 481 491 501
 TGCAACCTGG GCCTGCTGCT CCCCCGCCCC GACTGCCCTT TCCCCGGGAA GATCGAAGTC

 511 521 531 541 551 561
 CCGGAGAGT GCTGCGAGAA GTGGGTGTGC GACCCACGGG ATGAAGTGCT CCTGGGAGGC

 571
 TTGCTATG CT

ENCHAINEMENT IX

109 119 129 139 149 159
 VLEGDNCFD GMIYRNGETF QPSCKYQCTC RDGQIGCLPR CNLGLLLPGP DCPFFPRKIEV

169 179
 PGECEKWC DPRDEVLLGG FAMA

ENCHAINEMENT X

116 131 146
 GCG GTA GAG GGA GAT AAC TGT GTG TTC GAT GGG GTC ATC TAC CGC
 A V E G D N C V F D G V I Y R
 161 176 191
 AGT GGA GAG AAA TTT CAG CCA AGC TGC AAA TTC CAG TGC ACC TGC
 S G E K F Q P S C K F Q C T C
 206 221 236
 AGA GAT GGG CAG ATT GGC TGT GTG CCC CGC TGT CAG CTG GAT GTG
 R D G Q I G C V P R C Q L D V
 251 266 281
 CTA CTG CCT GAG CCT AAC TGC CCA GCT CCA AGA AAA GTT GAG GTG
 L L P E P N C P A P R K V E V
 296 311 326
 CCT GGA GAG TGC TGT GAA AAG TGG ATC TGT GGC CCA GAT GAG GAG
 P G E C C E K W I C G P D E E
 341
 GAT TCA CTG GGA GGC CTT ACC CTT GCA G
 D S L G G L T L A

ENCHAINEMENT XI

10	20	30	40	50	60
AAAAGGACTT	GGGTTTGGG	ACATGCCCTC	CAAACTCTTAC	ATAGCTTCTT	CACTGTATTG
70	80	90	100	110	120
TGTTCTTGTT	TTTCCCTCTC	CTCTTTGCTT	TTCACCTTGC	TTCCCCAATA	TTCTAGCGGT
130	140	150	160	170	180
AGAGGGAGAT	AACTGTGTGT	TCGATGGGGT	CATCTACCGC	AGTGGAGAGA	AATTTCAGCC
190	200	210	220	230	240
AAGCTGCAAA	TTCCAGTGCA	CCTGCAGAGA	TGGGCAGATT	GGCTGTGTGC	CCCCGTGTCA
250	260	270	280	290	300
GCTGGATGTG	CTACTGCCCTG	AGCCTAACTG	CCCAGCTCCA	AGAAAAGTTG	AGGTGCCCTGG
310	320	330	340	350	360
AGAGTGCTGT	GAAAAGTGGA	TCTGTGGCCC	AGATGAGGAG	GATTCACCTG	GAGGCCCTTAC
370	380	390	400	410	420
CCTTGCAGGT	GAGAAACTCA	ATATACCTAG	GGCTGGTCAT	AGTAGAGGGT	AAATACAAAC
430	440	450			
ATGAAGAATT	TGCAATCTCT	TGGATTGAA	AA		

ENCHAINEMENT XII

125 135 145 155 165 175
 GCGGTAGAGG GAGATAACTG TGTGTTTCGAT GGGGTCATCT ACCGCAGTGG AGAGAAATTT
 185 195 205 215 225 235
 CAGCCAAGCT GCAAATTCCA GTGCACCTGC AGAGATGGGC AGATTGGCTG TGTGCCCCGC
 245 255 265 275 285 295
 TGTGAGCTGG ATGTGCTACT GCCTGAGCCT AACTGCCCCAG CTCCAAGAAA AGTTGAGGTG
 305 315 325 335 345 355
 CCTGGAGAGT GCTGTGAAAA GTGGATCTGT GGCCCAGATG AGGAGGATTC ACTGGGAGGC
 365
 CTTACCCCTTG CAG

ENCHAINEMENT XIII

583 593 603 613 623 633
 GCATACAGAC AGGAGGCCAC ACTTGGGATA GACGTGTCTG ATTCAAGTGC CAATTGTATT
 643 653 663 673 683 693
 GAACAGACAA CAGAATGGAG TGCTTGTTC AAAAGCTGTG GAATGGGCTT TTCTACCCGT
 703 713 723 733 743 753
 GTTACCAACA GAAATCAGCA GTGTGAGATG GTGAAGCAGA CAGGACTTTC CATGATGAGA
 763 773
 CCTTGTGAAA ACGAAGAGCC ATCTGATAA

ENCHAINEMENT XIV

193 203 213 223 233 243
 AYRQEATLGI DVSDSSANCI EQTTEWSACS KSCGMGFSTR VTRNRNQQCEM VKQTRLCCMMR

253
 PCENEERPSDK

ENCHAINEMENT XV

104 119 134
 GCT TAC AGG CCA GAA GCC ACC CTA GGA GTA GAA GTC TCT GAC TCA
 A Y R P E A T L G V E V S D S
 149 164 179
 AGT GTC AAC TGC ATT GAA CAG ACC ACA GAG TGG ACA GCA TGC TCC
 S V N C I E Q T T E W T A C S
 194 209 224
 AAG AGC TGT GGT ATG GGG TTC TCC ACC CGG GTC ACC AAT AGG AAC
 K S C G M G F S T R V T N R N
 239 254 269
 CGT CAA TGT GAG ATG CTG AAA CAG ACT CGG CTC TGC ATG GTG CGG
 R Q C E M L K Q T R L C M V R
 284 299
 CCC TGT GAA CAA GAG CCA GAG CAG CCA ACA GAT AAG
 P C E Q E P E Q P T D K

ENCHAINEMENT XVI

10 20 30 40 50 60
ATCAGAGTCG AATGAGACCC AGTTTCTAAT AATGGCTGAA AAGGACCACT TTCCAATCCT

70 80 90 100 110 120
CACATTGATC CTAATATGGC TGTCTTTATT TATACATCCC ATAGCTTACA GGCCAGAAGC

130 140 150 160 170 180
CACCCTAGGA GTAGAAGTCT CTGACTCAAG TGTCAACTGC ATTGAACAGA CCACAGAGTG

190 200 210 220 230 240
GACAGCATGC TCCAAGAGCT GTGGTATGGG GTTCTCCACC CGGGTCACCA ATAGGAACCG

250 260 270 280 290 300
TCAATGTGAG ATGCTGAAAC AGACTCGGCT CTGCATGGTG CGGCCCTGTG AACAAAGAGCC

310 320 330 340 350 360
AGAGCAGCCA ACAGATAAGG TAGGAGCCTG GAGGAAACCT CCCATCCTGA AGGTAATGGC

370 380 390 400 410 420
CTTGTCCTT TGGAGCCTGG GCTTCAGAAA GTCACTGTGG CACTCTGTGA CGGAGAGAGC

430
AGCTATAGCG GGGAG

ENCHAINEMENT XVII

113	123	133	143	153	163
GCTTACAGGC	CAGAAGCCAC	CCTAGGAGTA	GAAGTCTCTG	ACTCAAGTGT	CAACTGCATT
173	183	193	203	213	223
GAACAGACCA	CAGAGTGGAC	AGCATGCTCC	AAGAGCTGTG	GTATGGGGTT	CTCCACCCCG
233	243	253	263	273	283
GTCACCAATA	GGAACCGTCA	ATGTGAGATG	CTGAACACAGA	CTCGGCTCTG	CATGGTGCGG
293	303	313			
CCCTGTGAAC	AAGAGCCAGA	GCAGCCAACA	GATAAG		

ENCHAINEMENT XVIII

33	43	53	63	73	83
TATGAGACG	GGCGGGGGC	AGGGGCTGCC	CGTCCTGCTG	CTGCTCCTGC	TCCTCCTCCG
GCCGTGCGA					

ENCHAINEMENT XIX

10 20
METGGGGQLP VLLLLLLLR PCE

ENCHAINEMENT XX

285 300 315
ATG GCA ACC CCG GGG TTC GTT CCA CTT CCC CAC CCA GCC GAT CTC
M A T P G F V P L P H P A D L
330 345
CCC CCT CCT CCC TGC ACT GCA GCC AAC CGG CTT
P P P C T A A N R L

ENCHAINEMENT XXI

294 304 314 324 334 344
ATGGCAACCC CGGGGTTCGT TCCACTTCCC CACCCAGCCG ATCTCCCCCC TCCTCCCTGC
354
ACTGCAGCCA ACCGGCTT

ENCHAINEMENT XXII

NAC	GGG	GAG	ACG	TTC	CAG	CCC	AGC	TGC	AAG	TAC	CAG	TGC	ACC	TGC	CGG	GAC	GGG	GAC	AAC	TGC	GTG	TTC	GAT	GGG	ATG	ATT	TAC	CGC	365	
CTG	CTC	CCC	GGC	CCC	GAC	TGC	CCC	TTC	CCG	CGG	AAG	ATC	GAA	GTC	CCC	GGA	GAG	TGC	TGC	GAG	ANG	TGG	GTG	TGC	GAC	CCC	AGG	GAT	GAA	455
GTG	CTC	CTG	GGA	GGC	TTT	GCT	ATG	GCT	GCA	TAC	AGA	CAG	GAG	GCC	ACA	CTT	GGG	ATA	GAC	GTG	TCT	GAT	TCA	AGT	GCC	AAT	TGT	ATT	GAA	545
CAG	ACA	ACA	GAA	TGG	AGT	GCT	TGT	TCC	AAA	AGC	TGT	GGA	ATG	GGC	TTT	TCT	ACC	CGT	GTT	ACC	AAC	AGA	AAT	CAG	CAG	TGT	GAG	ATG	GTG	635
AAG	CAG	ACA	CGA	CTT	TGC	ATG	ATG	AGA	CCT	TGT	GAA	AAC	GAA	GAG	CCA	TCT	GAT	ANG												725

ENCHAINEMENT XXIII

Q	I	P	T	R	I	P	D	A	L	D	V	R	V	P
48				63					78					
Q	C	L	T	S	A	S	P	T	P	L	F	P	S	S
93				108					123					
S	P	A	K	D	G	A	P	C	I	F	G	G	T	V
138				153					168					
Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	C	K	Y	Q	C
183				198					213					
T	C	L	D	G	A	V	G	C	M	P	L	C	S	M
228				243					258					
D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	P	R	R	V
273				288					303					
K	L	P	G	K	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P
318				333					346					
K	D	Q	T	V	L	G	P	A	S	R	V	S	R	V
363				378					393					
F	L	*	V	R	V	V	I	L	S	Q	G	G	S	P
408				423					438					
N	C	A	D	R	T	G	E	I	P	Y	P	G	V	D
453				468					483					
H	G	V	C	V	L	C	S	R	S	L	P	T	G	R
498				513					528					
H	V	W	P	R	P	N	Y	D	*	S	Q	L	P	G
543				558					573					
P	D	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G
588				603										
Y	S	T	R	V	T	N	D	N	A					

ENCHAINEMENT XXIV

CTGCGTGTTCGATGGGATGATTACCGCAACGGGGAGACGTTCCAGCCAGCTGCAAGTACCAGTGCACC
 350 360 370 380 390 400
 190 200 210 220 230 240 250
 TGCCGGGACGGGCAGATCGGGTGCCCTGCCCGCCGCTGCAACCTGGGCTGCTGCTCCCGGCCCGACTGCC
 420 430 440 450 460 470
 CCTTCCCGCGGAAGATCGAAG-TCCCGGAGAGTGTGCGGAGAGTGGGTGTGCGAC
 490 500 510 520 530

ENCHAINEMENT XXV

EGDNCVFDGMIYRNGETFQPSCKYQCTCRDQIGCLPRCNLGLLLPGDPDPFPRKIEVPGECEKW
 110 120 130 140 150 160
 VCD-PR
 170

ENCHAINEMENT XXVI

40 50 60 70 80 90 100
 DGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPKCCCEEWVCDE
 PR

ENCHAINEMENT XXVII

[illegible]

ENCHAINEMENT XXVIII

190 200 210 220 230 240 250
 TGCCTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCGCCTGTTCAGACCTGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTTA
 260
 CCAA

ENCHAINEMENT XXIX

GCTTTGCTATGGCTGCATACAGACAGGAGGCCACACTTGGGATAGACGTGTCT--GATTCAAGTGCCAAT
 570 580 590 600 610 620
 TGTATTGAACAGACACAAGATGGAGTGTCTTCCAAAAGCTGTGGAATGGGCTTTCTACCCGTGTTA
 630 640 650 660 670 680 690
 CCAA

ENCHAINEMENT XXX *

TEWSACSKSCGMGFSTRVTNRN
 210 220

ENCHAINEMENT XXXI

TEWSACSKTCGMGISTRVTNDN
 70 80

ENCHAINEMENT XXXII

130 140 150 160 170 180
 CTGCTCTCGCAGCTTACCGACTGGAAGACACAGCTTGGCCCGAGACCCCACTATGATT-A-GAGCCAAAC
 0 200 210 220 230 240 250
 CTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCGCCTGTTCAGACCTGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTTA

ENCHAÎNEMENT XXXIII : fragment 1

10	20	30	40	50	60
GCTTCTTTT	TAAGGAACAG	TCCTTTCTTC	CCAAGAGAAC	TGCTCTTTCT	CTCCATTCCA
70	80	90	100	110	120
ACCATGAGGT	TCTAACTAAT	CCCCATACTT	CACCTTCCTT	GTCCCCCATTG	ATTAGTCCAG
130	140	150	160	170	180
GGTGAACCCA	TCCAATTAA	TTCCCTGGAAC	TTTAAAGTT	GGCCCTAAGA	GACAGGGACA
190	200	210	220	230	240
TTCCTTCTGT	GGTGATAAGG	TCATAAAGTA	AGAAGATTGG	AAGGATCATT	TTTCCCTTAT
250	260	270	280	290	300
GTGGAAGTAA	TCCTGTTGGC	CCTCCTCTCT	CTAGATCCCA	ATTGCCTCTG	AGGACTCCCT
310	320	330	340	350	360
GTACCATTC	TGTGCTGTCA	CTATGTGAA	CATCACAGCA	TCCTTCCAGT	AAAGTCCCTCT
370	380	390	400	410	420
TTTCGCAAAA	ACTAGTTCAA	GTTTGGTTTC	CATCTCTTGC	AATCAAAACT	GAATAGCAAT
430	440	450	460	470	480
TTTACACTTG	CAGTGACTTC	TTGACATGTT	AATCCTTGTC	TTAAAGTTAC	ATTTTCCCTG
490	500	510	520	530	540
TCACCACTCC	CACCCCACTC	TTTCCAAGAA	GAGCTAGCCC	AATCTCCATG	TTGCCAATTT
550	560	570	580	590	600
CTCCTTGTT	TATCTGAGTC	TATTCATGCT	TGGAACACTT	GGCCGATGCT	CTTTGCCCTCC

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 1 (suite)

610	620	630	640	650	660
CCATTAGCAG	TGCTTCTAGT	TGCTCCATTT	CAAAGTACAT	TAAATGCTG	TCTACCAAGA
670	680	690	700	710	720
610	620	630	640	650	660
CCATTAGCAG	TGCTTCTAGT	TGCTCCATTT	CAAAGTACAT	TAAATGCTG	TCTACCAAGA
670	680	690	700	710	720
730	740	750	760	770	780
GCCACCA	GAGATCCTA	CTGAGTGGT	CAAGACTGG	GCTCAGGAAT	CTGTATTTT
730	740	750	760	770	780
AACAAATAC	ATGCTGGTG	ATTCGATCTG	CAGCCAGATG	GAGGCATCAT	TAGGCCAAAT
790	800	810	820	830	840
GGCTTACAA	ACCTATCAGT	TTTTTTGTTT	TTTGTTTTAT	CTTTTCTTA	AACTTTAT
850	860	870	880	890	900
TCAAGTTCAG	GGGAAATGTG	CAGGTTTGT	TACACAGGAA	ATGTGTCATG	GACATTTGTT
910	920	930	940		
GTCAGATTA	TTTCATCGCC	CAGGTATTAA	GCCTGGTACC	GAGGTACC	

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2

10	20	30	40	50	60
CATTAGTTAT	TTTTCCCGAT	CTTCTCCCTG	CTCCCACCCT	CCACCCTCCA	AAGCCATATCA
70	80	90	100	110	120
ATTGAAGAG	TAGGTAATG	TCCTACTCAA	GAGTGCAAAT	GAACTGTTTC	ATCTCTAGTT
130	140	150	160	170	180
AAGTTTGAGT	ACTACTCAGT	CTCATTTACC	TCAAAGAAAG	CAGAACTATT	AGAGGCTTGG
190	200	210	220	230	240
AAGTGTGTCA	TAGTGGTTTC	AGGCTGCCGA	GAGAAATTATC	TAGAAGGGGC	TTGAGGTGAC
250	260	270	280	290	300
CTCATCATCT	GCGGGTGTG	CAGAGGCAGA	CCTGGCCCCCT	TCCGCAAGCT	GCCTTTGATT
310	320	330	340	350	360
TCCTTCATGC	TGGGGACAGA	TGAGGTAGAG	GCCATTGTT	TCTTTTTAAA	CTCTAGAATT
370	380	390	400	410	420
ACATCACAGG	CCTGTATAAT	TTTCCTTAAA	AAGTGTTTTT	TGTTTTTTTC	CAAAGCAACT
430	440	450	460	470	480
ATCCTCAAAA	GAGCTGGGCA	TAGTTCTCCT	AGGGGCAGCA	CCAGTGTTGA	AGTGTGGGG
490	500	510	520	530	540
GAAACTGTTT	TAAATCCTTC	AAACAATGTC	ACCTTTGGAG	CAGTAAAACT	GCTCCCCTTT
550	560	570	580	590	600
TCCCCATGAGA	GATGACAAGC	ATGCCCCCAGC	AATCATTTCT	TGAAAGCGGA	TGCCCCGGTGA
610	620	630	640	650	660
GAGAAGGATT	TGATTTGCTG	AAGGGTCAGC	CAAGTTAAGC	CAGTTTCTTC	CTCATTTCTT

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2 (suite)

670	680	690	700	710	720
CCCTGGCTGG	AGGTTTGTAT	GGTGGTGATG	GTGGTTGAAC	TGAACCCACT	TAGAAAACCTG
730	740	750	760	770	780
TCAAGGTTT	CTGGACTCTC	AGGTGTGCCG	TCTCACATTT	GGTCTGCTAC	AGCAGGTGCT
790	800	810	820	830	840
TCAAGGCTTT	CTTCTGCCAA	GATTCTTTG	TTTTATTTTA	TGATGTTTC	TTTATGTGTG
850	860	870	880	890	900
TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTTTTAC	TTTTATTCT	AACAAACCTG
910	920	930	940	950	960
TGACCTTGGG	GTTTAAGACT	GAGTGAAGCT	AGAAGGATTA	GAGTCAAAAG	AATTTTGCCA
970	980	990	1000	1010	1020
TTTGGCCAAT	AGCATTCCCC	CACCTCCTGA	CATATCGATT	TTTTTTCTAG	ATTCCTTCC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CCCTGCCACT	CCCCCTCCCC	CAACACACAC	ACACTTTTCT	CTTTCTCCTC	TTTCTCTCCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTCCCTCCCTT	GCTTCTCTCC	CCTCCCTCTC	AACACATTCA	ATGAGTGCCC	TAAACGGTGA
1150	1160	1170	1180	1190	
CNAACITGCA	TGTGCTTCCC	TCATGACTAA	ACCCCTGGCC	TTCTGCCAAT	CCCCCTGCAG

ENCHAÎNEMENT XXXIII : fragment 3

10	20	30	40	50	60
CTGCAGGCAT	CCCGTAAGGA	CCCCACGCTT	GCAGCCCTGG	TTGGAACGGT	CAGGGTGGAG
70	80	90	100	110	120
GAGGATGGTG	GGGAGTGGTG	GTGTCTTCGT	CCTGGGAGAA	GGCGAAGCAA	CTTCCAGGAG
130	140	150	160	170	180
GAAACGGGCG	TTTCCTTCCC	ACGCGCTCGA	GCGAGCCCTG	GGTCTGGCC	TCGGAACCTCC
190	200	210	220	230	240
ACCCAGCCCC	TCCCCACCCCT	CTGGGAAAAG	CCAGTCGCCA	CACACAGGCA	CACGCAGGCC
250	260	270	280		
CCGGCGCCGC	GCCCTAAGGA	GAGCAGCACC	CACAGCCAAT	TGCC	

ENCHAINEMENT XXXIV

10	20	30	40	50	60
CGAATTTT	AGGAATCCT	GCTGTTGCC	TCTTCAGCTA	CCTACTTCCT	AAAAAGGATG
70	80	90	100	110	120
TATGTCAGTG	GACAGAACAG	GGCAAACTTA	TTCGAAAAAG	AAATAAGAAA	TAATTGCCAG
130	140	150	160	170	180
TGTGTTTATA	AATGATATGA	ATCAGGAGTG	GTGCGAAGAG	GATAGGGAAA	AAAAAATTCT
190	200	210	220	230	240
ATTGGTGCT	GAAATACTG	CGCTTTT	TTTCCCTTTT	TTTTTTTCT	GCGAGCTGGA
250	260	270	280	290	300
GTGTGCCAGC	TTTTTCAGAC	GGAGGAATGC	TGAGTGTCAA	GGGTCAGGA	TCAATCCGGT
310	320	330	340	350	360
GTGAGTTGAT	GAGGCAGGAA	GGTGGGAGG	AATGCCAGGA	ATGTCCCCTGT	TTGTGTAGAC
370	380	390	400	410	420
TCCATTACGC	TCATTGGCGA	GCGCCGCCGC	CCGGAGCGTA	TAAAGCCTC	GGCCGCCCGC
430	440	450	460	470	480
CCCAAACTCA	CACAACAACT	CTTCCGCTGA	GAGGAGACAG	CCAGTGCGAC	TCCACCCCTCC
490	500	510			
AGCTCGACGG	CAGCCGCCCC	GGCCGAGAGC	CCCGA		

ENCHAINEMENT XXXV

10	20	30	40	50	60
GTGAGTGCT	GTGTTTCAGTT	TTGGGCCCCCT	CACTACAAGA	CATCGAGGCC	ATGGAGTGTG
70	80	90	100	110	120
TCCAGAGAAG	GGCACGAGGT	GGTGAGGAGT	CTGGAGCACACA	TGTTTATTG	GAAGCAGCTG
130	140	150	160	170	180
AGGAAGTTGG	GATTGTTTCAG	TCCGGAGAGG	CTCAGGGGAAA	ACATTATTGC	TCTTTAAAAA
190	200	210	220	230	240
TCCCTGGAAG	GAGGTTGTGG	TGAGGTGGAG	GTCGGCCCTCT	GCTCCCAGGT	ATCAGTGATA
250	260	270	280	290	300
GGATGAGAGG	GAACTGTCTT	AAATTATGCC	AGGGGAGTTT	CAGTTTGGAT	ATCAGGAACA
310	320	330	340	350	360
ATTTTTTTC	TCCAAAAAAT	TGGTGAGGTA	CTGCCACAGT	CTGCCCCAGCG	AGGTGGAATC
370	380	390	400	410	420
ACCATCCCTG	GAGATGTTCA	GGAAACGTGT	AGATGTGGCA	CTGAGGGGATG	TGGTTTAGTG

ENCHAINEMENT' XXXV (suite)

430	440	450	460	470	480
AGAAATGGTAG	GGATGGGTTG	ATGGTTGGAC	TAGATTAGCT	TAGCGATCTT	TCCAGTCATA
490	500	510	520	530	540
ACGATCCTGT	GATCCTACGA	TCCTAAGGCG	CCGGCCCCCAG	CGGAGCAGAC	CCGCAGGCTT
550	560	570	580	590	600
CAGCCCCCGA	GCCCCGGCGG	CGCGTCGGGA	CGCGGGCAGG	GCCGGGCACC	GCCGGGCAGG
610	620	630	640	650	660
TGGCGGAGCA	CAACGGGGAG	CGGAGCGTAG	GGCCCTGCCG	GGCTCCAGCT	CCCCGCCCTCC
670	680	690	700	710	720
GTCCCCGCGT	GCCGGTGGCG	GGGCGTGAGG	AGGGGGGGCG	GGGGGGGGGG	GTCCCTACCG
730	740	750	760	770	780
GCCTCTATAT	AAGCGGCCCG	AATGGCTTTG	CCGCCAGAGC	CGAGCGGCGC	GGCGGGTCAG
790					
ACGGCCGGGA	CT				

REVENDICATIONS

1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSCC) avec une ou plusieurs séquences du gène *nox* de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I) et plus spécialement avec l'enchaînement (II).

2/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes de la revendication 1, avec au moins une partie du deuxième exon du gène *nox* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

3/ Séquences de nucléotides selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine renfermant une séquence ayant une homologie d'au moins 70 % avec le fragment de protéine correspondant au deuxième exon du gène *nox* de poule, ce fragment présentant la séquence d'acides aminés (IV).

4/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique étant représentée sur la figure 2A.

5/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une séquence d'acides aminés présentant l'enchaînement V.

5

6/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie du l'enchaînement nucléotidique (VI), plus spécialement de l'enchaînement (VII).

10

7/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

15

8/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 70 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (IX).

20

25

9/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question étant représentées sur la figure 2A.

30

35

10/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'elles

comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) en acides aminés.

5 11/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XII).

10 12/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes données dans la
15 du gène nox de poule, qui comprend l'enchaînement (XIII).

20 13/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène nox de poule répondant à l'enchaînement (XIV) en acides aminés.

25 14/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12 ou 13, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XV) en acides aminés.

30 15/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XVI).

35 16/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du

premier exon du gène *nox* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XVIII).

5 17/ Séquences de nucléotides selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 30 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au premier exon du gène *nox* de poule, ce fragment présentant l'enchaînement (XIX)
10 en acides aminés.

15 18/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XX) en acides aminés.

20 19/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).

25 20/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène *nox* de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

30 21/ Séquences de nucléotides selon la revendication 20, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIII) en acides aminés.

35 22/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 21, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième

exon du gène *nox* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XXII).

5 23/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène *nox* de poule répondant à la séquence
10 (XXIII) en acides aminés.

 24/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une
15 protéine ayant la séquence (XXIV) en acides aminés.

 25/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement
20 nucléotidique (XXV), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XXVI).

 26/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisées en ce qu'elles sont
25 formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes données dans la revendication 1 avec au moins une partie du quatrième exon du gène *nox* de poule, qui comprend l'enchaînement de nucléotides (XXVII).

30 27/ Séquences de nucléotides selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine
35 potentiel correspondant au quatrième exon du gène *nox* de poule répondant à l'enchaînement (XXVIII) en acides aminés.

28/ Séquences de nucléotides selon la revendication 26 ou 27, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIX) en acides aminés.

5

29/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XXX).

10

30/ Les ARN et séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 29.

31/ Vecteurs recombinants de clonage et d'expression, capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans la cellule hôte.

20

32/ Souches de microorganismes transformées ou transfectées, caractérisées en ce qu'elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 ou encore un vecteur recombinant selon la revendication .

25

33/ Les protéines correspondant aux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 30.

30

34/ Les anticorps polyclonaux et monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement une protéine selon la revendication 33, ou un fragment d'une telle protéine.

35

35/ Sonde de détection, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 30.

36/ Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides complémentaires de celles selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde nucléotidique selon la revendication 35 dans
10 des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,

- la détection du complexe d'hybridation, et
15

- le cas échéant l'amplification, avant l'étape de mise en contact, des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 susceptibles d'être
20 contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et, d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,

37/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences complémentaires des
25 séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 35,
30

- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde, et, avantageusement,
35

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

5 38/ Procédé de dépistage in vitro de la présence dans un échantillon biologique des protéines selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 34, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie des protéines et cet anticorps, et

15 - la détection du complexe immunologique.

20 39/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de protéines selon la revendication 21 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 33,

30 - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine et l'anticorps et, avantageusement,

35 - des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine recherchée et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

40 / Procédé de détection dans un échantillon biologique de protéines selon la revendication 33, ou de leurs fragments, caractérisé par la mise en contact des protéines de l'échantillon, ou de leurs fragments, avec un IGF portant un groupe marqueur et le dosage de la quantité de produit fixé.

- 5 41/ Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux amplimères d'environ 15 nucléotides, compris dans l'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

FIGURE 1



nov mRNA

CGCGCGGTAGACGGCGGGACT	ATG	GAG	ACG	GGC	GGC	GGG	GAG	GGG	GAG	GGG	CTG	CCC	GTC	CTG	CTG	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	CGG	CCG	TGC	GAG	GTG	95
	M	E	T	G	G	G	Q	G			L	P	V	L	L	L	L	L	L	L	L	R	P	Ⓢ	E	V	
ACG	GGG	CGG	GAG	GGC	GGC	GGG	GGG	GGC	GGC	GGG	TGC	CCC	CGG	GAG	CCG	CCG	TGC	GGC	CGG	GGA	GTG	CCC	GCC	GCC	GTG	CTG	185
S	G	R	E	A	A						Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	A	E	P	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ		
GAC	GGC	TGC	GGC	TGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	TGC	AGC	TGC	TCC	CCT	CTG	CTG	CCC	TGC	GAC	GAG	AGC	GGC	GGC	CTC	TAC	275
D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ		
TGC	GAC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	ATC	TGC	ATG	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ		
Ⓢ	D	R	G	P	E	D	G	G	A	G	I	Ⓢ		Ⓢ	M	V	L	E	G	D	N	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ		
AAC	GGG	GAG	ACG	TTC	CAG	CCC	AGC	TGC	NAG	TAC	CAG	TGC	ACC	TGC	CGG	GAC	GGG	CAG	ATC	GGG	TGC	CTG	CCC	TGC	AAC	CTG	455
N	G	E	T	F	Q	P	S	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ			
CTG	CTC	CCC	GGC	CCC	GAC	TGC	CCC	TTC	CCG	CGG	AGC	ATC	GAA	GTC	CCC	GGA	GAG	TGC	GGG	AGG	TGC	CTG	GGC	GGC	GAT	GAA	545
L	L	P	G	P	D	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ			
GTG	CTC	CTG	GGA	GGC	TTT	GCT	ATG	GCT	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ			
V	L	L	G	G	F	A	M	A	A	A	Y	R	Q	E	A	T	L	G	I	D	V	S	S	A	N	Ⓢ	635
CAG	ACA	ACA	GMA	TGG	AGT	GCT	TGT	TCC	AAA	AGC	TGT	GGA	ATG	GGC	TTT	TCT	ACC	CGT	GTT	ACC	AAC	AGA	AAT	CAG	CAG	ATG	725
Q	T	T	E	W	S	A	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ			
AAG	CAG	ACA	CGA	CTT	TGC	ATG	ATG	AGA	CCT	TGT	GAA	AAC	GAA	GAG	CCA	TCT	GAT	AAG	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ		
K	Q	T	R	L	Ⓢ	M	M	R	P	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ			

FIGURE 1 (suite)

ATG AAA GCT GTT CGT TTT GAA TAC AAG AAC TGC ACC AGT GTG CAG ACT TAC AAA CCT CGT TAC TGT GGC CTC TGC AAT GAT GGG CGA TGC
H K A V R F E Y K N C T S V Q T Y K P R Y C G L G D G R C 905

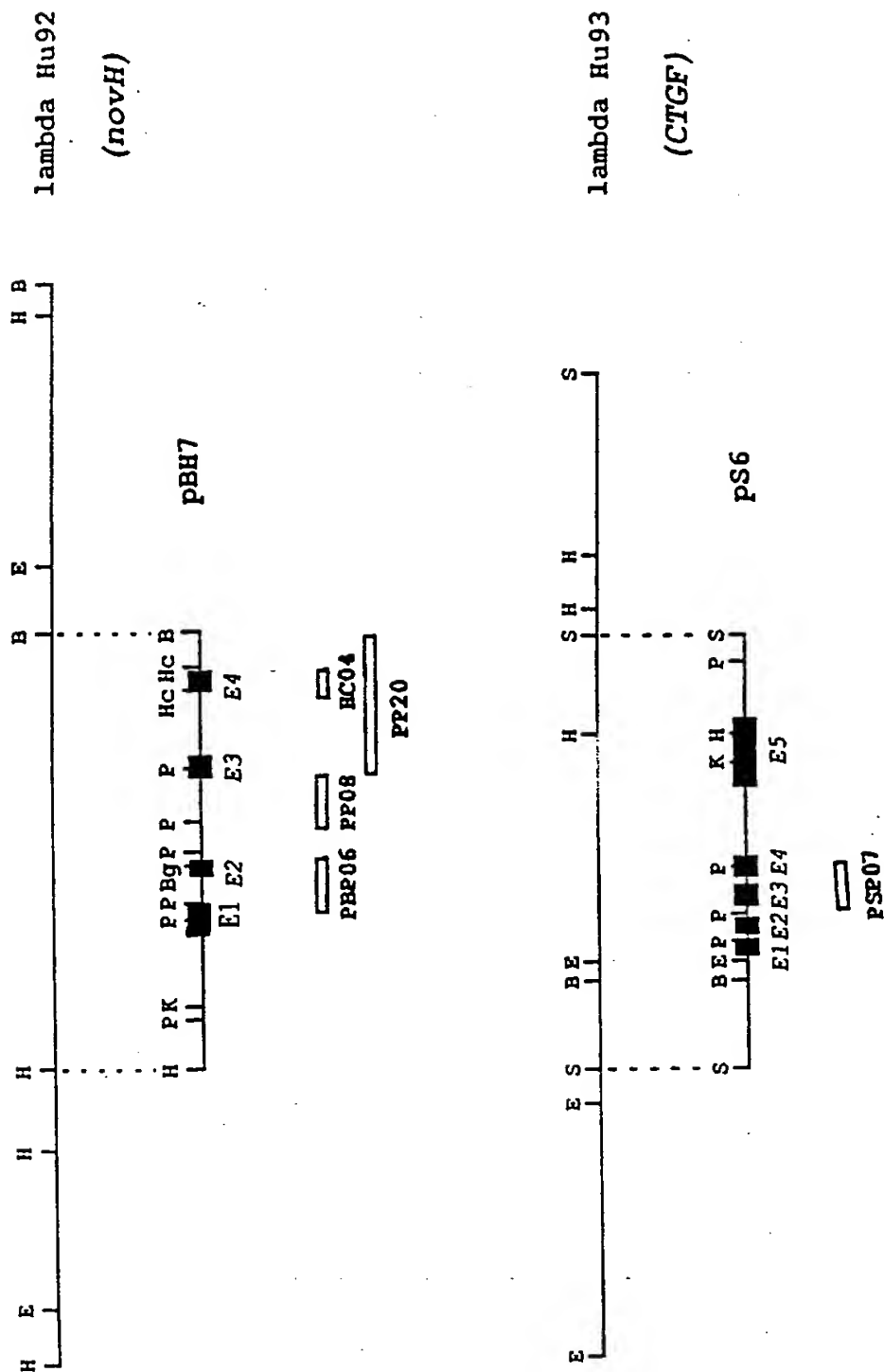
TGT ACC CCA CAC AAC ACC AAA ACG ATT CAA GTT GAG TTC CGC TGT CCT CAG GGC AAA TTC CTA AAA AAG CCA ATG ATG TTG ATC AAT ACC
C T P H N T K T I Q V E F R C P Q G K F L K K P M L I N T 995

TGT GTC TGT CAT GGT AAC TGT CCT CAG AGT AAC AAT GCT TTC TTC CAG CCA TTA GAT CCC ATG TCT AGT GAA GCA AAA ATA TGAATGTATA
C V C H G N C P Q S N N A F F Q P L D P M S S E A K I * 108

GTTAGTGCCCCAAAGGTATGTAGTTTGTACAAAACCTGACCCACANTCAGGTGATGTATATATTGCATATGTAAATATCTGAGATTTTCTTAAACAGCTCTGAGTGCCCTTTT
TTTCCTGTAGTTTACATAATACCTCATGAGCTTTCACCCCTCCAAATGTCTTTATTTCATTGAAGGAATTTTGTACCTTGGACAGAGCCCTCTGTGTTCTTGACAGTGGCATAAC
GATTACAAGCTCAACAGCTAGTCTTCTCTGTGAGTTAGAGGACCTTGCCATGATTTTCAGTAGCCATAGACNCTGGCCCTTTTAATATGGAATTCCTTGGGAATGCATGATATATG
TCACAAAGCTTCCAGAGTTTTCACCTTGCATATATGIGTACAAACACTTACACAGCCCTTCTTCTTCTGTTCNAGTTAAATCTTCCGGATTAAGTAAATGTACTGATGAGAGCTG
AATCTCTGGCTTATAAAGTATCTTCATCTGTACCTCTTGACTTCTCTGAGGGATAGTTTGCACATAGCCCTCAGAAATGCATAGCTAAGATCTCGTATCTTGAAGCATAGAGGA
TTGATAGCTGATAACAAATTTCTCATTCTGTAGCTTTTATAGCAGCCCTATCCAAACCTACTGAAGAAAGTGTCTTACAGAGCTTGGTTCTAACCAAGTGTCTGTAGATAAAGTA
GTTGTATGCAAAATAAAATTTCTGTAAATTCCTTTAAATATACTAATCTGATTCAGATGGTGCTTCCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATAGAACTGATATATTGTAATAAAT
TTTATTAGTAAATTAAGCTTTATGTGATCAAAATGAAAAAATAAAAAA 120

1320
1440
1560
1680
1800
1920
1975

FIGURE 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/12; C07K15/00; C12P21/08; C12Q1/68
 C12N1/21; G01N33/53; G01N33/574; C12P19/34
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5: C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES vol. T313, No. III, September 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' see the whole document ---	1-41
O,X	Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol. 32 see page 312, abstract No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al. ---	1-41

-/-

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1992 (16.10.92)

Date of mailing of the international search report

2 November 1992 (02.11.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, No. 1, January 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' see the whole document</p> <p>-----</p>	1-41

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00589

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/12; C12N1/21;	C07K15/00; G01N33/53;	C12P21/08; G01N33/574; C12Q1/68 C12P19/34
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
P,X	COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES vol. T313, no. III, Septembre 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' voir le document en entier ---	1-41
O,X	Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol 32 voir page 312, Abrégé No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al. --- -/-	1-41
⁹ Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ ^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent ^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date ^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) ^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens ^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée ^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention ^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive ^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. ^{"A"} document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 OCTOBRE 1992		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 02. 11. 92
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé VAN PUTTEN A.J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁶	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P, X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' voir le document en entier -----	1-41